

C-140  
03  
2/2



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                    2 0 0 3 年    6 月 2 3 日  
Date of Application:

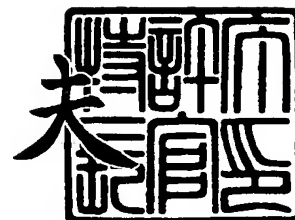
出 願 番 号                    特 願 2 0 0 3 - 1 7 8 2 2 0  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                    [ J P 2 0 0 3 - 1 7 8 2 2 0 ]

出      願      人                    味の素株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 0 月 2 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫





【書類名】 特許願

【整理番号】 6328

【提出日】 平成15年 6月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1  
                        味の素株式会社内

    【氏名】 竹田 元治

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1  
                        味の素株式会社内

    【氏名】 若林 眞

【発明者】

    【住所又は居所】 三重県津市浜町 1 5 1 5

    【氏名】 後藤 正和

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1  
                        味の素株式会社内

    【氏名】 塚原 明

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1  
                        味の素株式会社内

    【氏名】 湯村 孝治

【特許出願人】

    【識別番号】 000000066

    【氏名又は名称】 味の素株式会社

    【代表者】 江頭 邦雄

**【代理人】****【識別番号】** 100085109**【弁理士】****【氏名又は名称】** 田中 政浩**【先の出願に基づく優先権主張】****【出願番号】** 特願2003- 5750**【出願日】** 平成15年 1月14日**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 000402**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【包括委任状番号】** 9006337**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 サイレージ添加剤およびこれを用いてなるサイレーズの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】  $\text{pH}$  3.0～6.0 の酸性領域に調整されたアミノ酸発酵副生液からなるサイレーズ添加剤。

【請求項 2】 アミノ酸発酵副生液が、L-グルタミン酸、L-リジン又は L-フェニルアラニン発酵副生液である請求項 1 記載のサイレーズ添加剤。

【請求項 3】 サイレージ原料に、 $\text{pH}$  3.0～6.0 の酸性領域に調整されたアミノ酸発酵副生液を原料新鮮重当たり 1.0～10.0% 添加して嫌氣的に発酵させることを特徴とするサイレーズの製造法。

【請求項 4】 更に乳酸菌および糖類を添加してなる請求項 3 記載のサイレーズの製造法。

【請求項 5】 アミノ酸発酵副生液が、L-グルタミン酸、L-リジン又は L-フェニルアラニン発酵副生液である請求項 3 又は 4 記載のサイレーズの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サイレーズ発酵における乳酸菌を増殖させ、長期保存性を高め、2 次発酵を抑制し、消化性を改善し、窒素成分の付与も兼ね備えた家畜に有効なサイレーズ添加剤およびこれを用いてなるサイレーズの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

各種牧草等の粗飼料及び麦類、トウモロコシ類、キビ類・飼料用イネ等の飼料作物、豆腐粕、サツマイモ又はジャガイモ澱粉粕、焼酎粕等の食品製造副産物及び、外食産業や食品流通業界から排出される残渣等の貯蔵・保存方法としてのサイレーズ製造は、空気を遮断して嫌気状態にし、乳酸発酵によってその  $\text{pH}$  を急激に下げてサイレーズ発酵初期段階での好気性菌の生育や、続いて起こる嫌気化

初期の酪酸発酵の抑制を図ることにより、栄養性及び嗜好性を保存する方法である。従来、反芻家畜・豚及び家禽の飼料原料の貯蔵・保存及び品質改善法として広く畜産現場で行われている。サイレージ初期発酵のトラブル防止策として、蟻酸、蟻酸アンモニウム、クエン酸などの酸性化剤添加による不良発酵抑制が行われている。サイレージは初期発酵に続く本発酵である嫌気発酵促進のために、原料に付着した乳酸菌の増殖促進とそれに伴う pH の低下のため、種々の乳酸菌製剤を増殖のスターターとして、又糖蜜・グルコース等が糖源として添加されている。乳酸菌発酵終了後、またはサイレージ開封後の 2 次発酵がサイレージ品質を劣化するのを防止するためにプロピオン酸などの防腐剤が添加されている。一方、サイレージ乳酸発酵は植物原料に多く含有されている繊維成分の分解能はほとんどなく、原料の消化性を改善する目的で、酵素剤、尿素、アンモニア等が単独にまたは混合して添加されている。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

サイレージ品質において最も重要な乳酸発酵は、高価な乳酸菌製剤を添加しなくても、通常天然原料には乳酸菌が  $10^3$  程度付着しているため、本来これによって行われる。しかし、サイレージ調製中の条件はさまざまであり、乳酸菌叢並びに、乳酸菌叢と不良発酵菌叢との優先関係もまちまちであり、どのような調製条件でも乳酸発酵を強力に促進する方法が求められている。

#### 【0004】

サイレージ調製の対象となる各種牧草等の粗飼料及び麦類、トウモロコシ類、キビ類・飼料用イネ等の飼料作物、豆腐粕、サツマイモ又はジャガイモ澱粉粕、焼酎粕等の食品製造副産物及び、外食産業や食品流通業界から排出される残渣等は、繊維質で消化性に乏しいことも多く、繊維成分の消化性改善は飼料コストの面からは極めて重要である。このためにアンモニア・尿素、高価な繊維分解酵素などが市販されているが、前者の処理では危険作業を伴う。サイレージ品質と消化性の改善効果を有し、安価で操作上容易且つ危険性のない添加物の開発が求められている。

#### 【0005】

豆腐粕、サツマイモ又はジャガイモ澱粉粕、焼酎粕等の水分が高く、糖分に富む食品製造副産物及び、外食産業や食品流通業界から排出される残渣は、生産後数時間以内で腐敗が進み、豊富な家畜栄養源を含有しているにもかかわらず、産業廃棄物として処理されている。これらの食品製造残渣を安価で操作が簡単な保存処理により飼料原料として使用されることが求められる。

#### 【0006】

本発明の目的は、サイレージ発酵における乳酸菌を増殖させ、保存性に富み、高乳酸含量で2次発酵しない且つ高消化性で、窒素分量にも優れた家畜に有効なサイレージ調製のためのサイレージ品質改善用添加剤を提供することにある。

#### 【0007】

本発明の他の目的は、当該サイレージ添加剤を用いて消化率の向上した飼料価値の高いサイレージを製造する方法を提供することにある。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記した課題を達成すべく鋭意研究した結果、工業的に安価に且つ大量に入手し得るアミノ酸発酵副生液が本目的に合致し、サイレージ添加剤として有用であることを見出し、本発明をなすに至った。

#### 【0009】

すなわち、本発明の第1は、pH 3.0～6.0の酸性領域に調整されたアミノ酸発酵副生液からなるサイレージ添加剤である。

#### 【0010】

本発明の第2は、アミノ酸発酵副生液が、L-グルタミン酸、L-リジン又はL-フェニルアラニン発酵副生液であるサイレージ添加剤である。

#### 【0011】

本発明の第3は、サイレージ原料に、pH 3.0～6.0の酸性領域に調整されたアミノ酸発酵副生液を原料新鮮重当たり1.0～10.0%添加して嫌氣的に発酵させることを特徴とするサイレージの製造法である。

#### 【0012】

本発明の第4は、更に乳酸菌および糖類を添加してなるサイレージの製造法で

ある。

#### 【0013】

本発明の第5は、アミノ酸発酵副生液が、L-グルタミン酸、L-リジン又はL-フェニルアラニン発酵副生液であるサイレージの製造法である。

#### 【0014】

##### 【発明の実施の形態】

本発明において使用するアミノ酸発酵副生液は、糖蜜、タピオカ・トウモロコシ等の各種炭水化物原料を糖源とし、窒素源としてアンモニア、硫酸アンモニウム等の各種アンモニア態窒素原料を含有する培地にアミノ酸生産菌を培養して得られるアミノ酸発酵液からアミノ酸を分離除去した際に発生する副生液である。具体的に、ここにいう副生液とは、

① グルタミン酸等の酸性アミノ酸、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン等の中性アミノ酸の各種アミノ酸発酵液を硫酸、塩酸等の鉱酸をもってpHを等電点に調整し、析出した当該アミノ酸を固液分離したときに得られる母液およびその濃縮液、およびそれを脱塩濃縮したときに生じた液。また、母液を除菌した液およびその濃縮液、およびそれを脱塩濃縮したときに生じた液。これらに含まれるものとして、国際飼料として登録されている *Glutamic acid by-products (Condensed liquid)*、国際飼料番号 (IFN) 5-01-595がある。

② リジン等の塩基性アミノ酸発酵液を硫酸、塩酸等の鉱酸をもってpH調整した後、強酸性陽イオン交換樹脂を通じ、当該アミノ酸を吸着せしめた後の貫流液およびその濃縮液、およびそれを脱塩濃縮したときに生じた液。また、母液を除菌した液およびその濃縮液、およびそれを脱塩濃縮したときに生じた液。

#### 【0015】

これらのアミノ酸発酵副生液は、すべてpHは3.0～6.0の酸性側にある。成分はアミノ酸の他、窒素として揮発性塩基態窒素、アミノ酸有機態窒素および発酵菌体由来の窒素に富んでいる。また、ミネラルとしてはアミノ酸発酵液のpH調整時に使用した鉱酸由来の硫黄、塩素に富んでいる。その他、微量成分として上記以外のミネラル、ビタミン、糖類、有機酸、発酵菌体等を含有する。以上

の成分はサイレージ発酵微生物およびルーメン微生物の栄養分である。

#### 【0016】

サイレージ原料として各種牧草、稲ワラ等の粗飼料及び麦類、トウモロコシ類、キビ類・飼料用イネ等濃厚飼料、豆腐粕、サツマイモ又はジャガイモ澱粉粕、焼酎粕等の食品製造副産物及び、外食産業や食品流通業界から排出される残渣等が挙げられる。アミノ酸発酵副生液を原料新鮮重当たり 1.0～10.0% 加え、望ましくは水分含有率 60～70% に調整し、場合により糖類および乳酸菌を含有させる。均一に混合攪拌した後、固定式或いは可動式サイロまたはポリエチレン、ポリプロピレン等の合成樹脂性サイレージバックに封入して、40 日間程度嫌氣的に発酵させるという簡単な操作でサイレージ化し、長期間貯蔵することができる。

#### 【0017】

開封後、好気条件下に置いた場合も酵母、カビ発生等の二次変敗が殆ど起こらず、サイレージ品質の向上および安定化に大きく寄与する。

#### 【0018】

糖類として糖蜜、還元糖（例えば、マルトース、ラクトース、ショ糖、トレハロース、グルコース等）が用いられる。糖類の添加量は、原料の糖含量を踏まえて、新鮮重当たり 2% 以上になるように使用するのが適正である。

#### 【0019】

必要により乳酸菌製剤をスターターとして添加してもよい。適当な乳酸菌製剤として利用される菌種は、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) 等が挙げられる。添加量は原料の糖含量により、原料新鮮重当たり 0.05～1.0% が適正である。

#### 【0020】

糖類として糖蜜を利用する場合、あらかじめアミノ酸発酵副生液と 10～80% の混合割合（重量比）で調整しておくのが望ましい。

#### 【0021】

#### 【実施例】



以下、実施例 1～8 によって本発明を具体的に説明する。尚、実施例 1～7 で用いたアミノ酸発酵副生液は、液体副産窒素肥料（PAL）として登録されており（登録番号：生第 74220 号）、pH 4.5、窒素全量 5.0%（内アンモニア性窒素 3.5%）、フェニルアラニン発酵副生液である（以下、単に「母液」と略称する）。

### 【0022】

実施例 1：代表的サイレージ乳酸菌を用いての単離菌培養試験

糖源として母液と糖蜜の混合液を 100:0～0:100 の混合割合（重量比）で作成し、この混合液を 804 液体培地（酵母エキス 5 g、ペプトン 5 g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1 g、蒸留水 1000 ml、pH 7.0）に還元糖濃度として 0.5% 相当になる量を添加し、乳酸菌ラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）を 30℃ で液体静置培養を行った。ここで用いた糖蜜は、製糖工場副生物で水分 25～30%、糖含量約 50% である。

### 【0023】

対照区としてグルコース濃度 0.5% の 804 液体培地を設定した。混合比と略称の詳細は表 1 に示した。

### 【0024】

【表 1】

母液と糖蜜の混合液の混合比と略称

略 称	母液100	母液80	母液60	母液50	母液40	母液20	糖 蜜
母液:糖蜜	100:0	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80	0:100

### 【0025】

培養方法は、乳酸菌ラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）を 804 液体培地（10 ml）で 24 時間培養し、種菌を作成した（pH 4.87）。

### 【0026】

次に本培養として、804 ベース液体培地（10 ml）に前培養した菌ラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）200 μl ずつ植菌（16

φ試験管使用) し、30℃恒温水槽で液体静置培養を行った。

#### 【0027】

そして、この培地より3時間おきに200μl サンプリング(48時間迄) し、15,000rpm、5分間の条件で遠心分離した。その後、上清液を除去、滅菌蒸留水200μlを加えて洗浄し、再度遠心分離した。最後に再度上清液を除去、波長600nmで測定できるように滅菌蒸留水で希釈し、波長600nmで吸光度(OD)を測定した。図1は培養時間による吸光度の変化を示した。尚、吸光度の増加はラクトバチルス・プランタラム菌が増殖したことを表す。

#### 【0028】

図1に示す結果から、母液の添加によりサイレージ乳酸菌が急激に増殖し、特にサイレージ発酵初期に見られる乳酸菌の増殖は5時間～9時間の間に行われることが分かる。

#### 【0029】

母液は同時にクロストリジウム・ブチリカム (*clostridium butylicum*) 等のサイレージ発酵を改悪させる不良発酵菌の単離菌培養でも同様の増殖効果が確認された。しかし、増殖開始は12時間～16時間と乳酸菌の増殖開始より遅い。乳酸菌との増殖促進作用の差異は明白であり、実際の場合ではこれら不良発酵菌は母液添加を行っても発現しにくいことが、次に示す大麦ホールクロップ実験で確認された。

#### 【0030】

実施例2：大麦ホールクロップボトルサイレージ試験

母液と糖蜜の混合液を80：20～20：80の混合割合(重量比)で作成し、材料の大麦ホールクロップの新鮮重当たり3%となるように添加し、これを1Lボトルに詰めこみ(詰めこみ密度500gFW/L)サイレージ試験を実施した。

#### 【0031】

対照区として母液無添加のサイレージを調製した。混合比と略称の詳細は表2に示した。

#### 【0032】

【表 2】

母液と糖蜜の混合液の混合比と略称

略 称	母液80	母液60	母液50	母液40	母液20
母液:糖蜜	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80

## 【0033】

サイレージを調製後40日目に開封し、試料を採取、10倍量の蒸留水を加えミキサーで粉碎し、ガーゼ濾過。濾液を遠心分離（15,000rpm、5分間、5℃）。上清液に2倍量の6%過塩素酸を添加し攪拌後、再度同条件で遠心分離。上清液を0.45μmフィルターで濾過し、液体クロマトグラフィー法によって乳酸と揮発性脂肪酸（以下、これら酸を「有機酸」と総称する）を測定した。

## 【0034】

表3に有機酸生成量と乾物損失率結果を、図2に総有機酸に占める乳酸、酢酸、酪酸の割合をそれぞれ示した。

## 【0035】

【表 3】

有機酸生成量と乾物損失率結果

供試サンプル	対照区	母液20	母液40	母液50	母液60	母液80
有機酸生成量(%FW*1)						
乳 酸	0.11	0.28	0.59	0.29	0.37	0.17
酢 酸	0.27	0.18	0.17	0.12	0.19	0.11
酪 酸	0.11	0.20	0.13	0.07	0.07	0.07
合 計	0.49	0.66	0.89	0.48	0.63	0.35
乾物損失率(%)	17.6	13.4	17.3	16.4	13.8	12.0

\*1:新鮮生重

## 【0036】

表3及び図2から明らかなように、総有機酸に占める乳酸の割合は、母液添加区の方が、対照区に比べ高い。これは乳酸菌による嫌気発酵が不良発酵菌に優先して進行したことを示している。その結果、乾物損失率を低める効果も示された。

## 【0037】

又、総有機酸に占める酢酸の割合は、母液添加区の方が対照区に比べ低い。このことは、糖を乳酸にのみ分解するホモ型乳酸菌が、糖を乳酸、酢酸、炭酸及び水に分解するヘテロ型乳酸菌に優先して増殖していることを示唆している。この結果も乾物損失率を低める効果になっている。

#### 【0038】

更に、総有機酸に占める酪酸の割合は、母液割合50以上の区では対照区に比べ低い。この結果も不良発酵を抑制し、乾物損失率を低める効果になっている。

#### 【0039】

また、母液添加により窒素成分が付与され、サイレージの粗蛋白含量は母液添加割合の増加に伴って増加する。この結果を図3に示した。

#### 【0040】

実施例3：サイレージ酵母を用いての単離菌培養試験

母液と糖蜜の混合液を100：0～0：100の混合割合（重量比）で作成し、この混合液をPYG液体培地（ペプトン10g、酵母エキス5g、蒸留水1000ml、pH6.7～6.8）に還元糖濃度として0.5%相当になる量を添加し、サイレージ酵母を30℃で液体静置培養を行った。

#### 【0041】

対照区としてグルコース濃度0.5%を設定した。混合比と略称の詳細は表4に示した。

#### 【0042】

【表4】

母液と糖蜜の混合液の混合比と略称

略 称	母液100	母液80	母液60	母液50	母液40	母液20	糖 蜜
母液：糖蜜	100：0	80：20	60：40	50：50	40：60	20：80	0：100

#### 【0043】

培養方法は、まず前培養としてサイレージ酵母をPYG液体培地（10ml）24時間培養し、種菌を作成した（pH6.7～6.8）。

#### 【0044】

次に本培養として、PYGベース液体培地（10 ml）に前培養したサイレー  
ジ酵母菌 200  $\mu$  l ずつ植菌（16  $\phi$  試験管使用）し、30℃（インキュベータ）  
浸透培養（200 往復／分）を行った。

#### 【0045】

そして、この培地より4時間おきに100  $\mu$  l サンプリング（16時間迄）し、  
15,000 rpm, 5分間の条件で遠心分離した。その後、上清液を除去、  
滅菌蒸留水 100  $\mu$  l を加えて洗浄し、再度遠心分離した。最後に再度上清液を  
除去、波長 600 nm で測定できるように滅菌蒸留水で希釈し、波長 600 nm で  
吸光度（OD）を測定した。図4に培養時間による吸光度の変化を示した。尚、  
吸光度の増加はサイレージ酵母菌が増殖したことを表す。

#### 【0046】

図4に示す結果から、サイレージ初期発酵で問題となる酵母生育については単  
離培養で母液の添加比率を上げるに伴い、顕著に抑制されることが確認された。

#### 【0047】

また、本試験は酵母の適正な培養試験であり、その状況はサイレージ開封後の  
好気、適度の湿度・温度・養分（乳酸、残糖等）とほぼ類似する。したがって、  
この結果はサイレージ開封後第一に活動を開始する酵母の活動を抑制する実証デ  
ータの一つになる。

#### 【0048】

実施例4：開封後の2次発酵によるサイレージ品質評価試験（エタノール含量の  
測定）

大麦ホールクロップボトルサイレージ試験でサイレージ調製、調製後40日  
目に開封し、開封直後と8日後のエタノール含量を測定した。母液と糖蜜の混合液  
を80:20～20:80の混合割合（重量比）で作成し、材料の大麦ホールク  
ロップの新鮮重当たり3%となるように添加し、これを1Lボトルに詰めこみ（  
詰めこみ密度 500 g FW/L）、大麦ホールクロップサイレージを調製した。

#### 【0049】

対照区として母液無添加のサイレージを調製した。混合比と略称の詳細は表5  
に示した。

【0050】

【表5】

母液と糖蜜の混合液の混合比と略称

略 称	母液80	母液60	母液40	母液20
母液:糖蜜	80:20	60:40	40:60	20:80

【0051】

調製後40日目のサイレージを、毎日一定時間（1時間程度）攪拌して空気と混合処理を施した。これを1日の開封とした。開封直後と8日後にサンプリングしエタノール含量を測定した。対照区及び母液添加試験区でのサイレージ開封直後と8日後のエタノール含量の測定結果を図5に示した。また、対照区及び試験区でのエタノール含量増加率（8日後／開封直後）を図6に示した。

【0052】

図5及び6から、サイレージ開封後のエタノール含量は母液割合の高い添加区ほど低いことが分かる。

【0053】

エタノールは本来サイレージでは酵母または、ヘテロ型乳酸菌によって生成されるものである。両者は共に通性嫌気性菌である。開封後は好気状態ではあるが、本実験のように残糖が残りやすい材料（穀実部分が糖分として残る場合がある）をサイレージにしたとき、上記微生物の活動はしばらく継続される。本実験の結果から母液の添加比率が上がるに伴い、これら微生物の活動は抑制される。

【0054】

実施例5：開封後の2次発酵によるサイレージ品質評価試験（有機酸含量の測定）

実施例2によって行った大麦ホールクロップボトルサイレージ試験でサイレージ調製、調製後40日目に開封し、開封直後と8日後の有機酸含量を測定した。

【0055】

対照区として母液無添加のサイレージを調製した。混合比と略称の詳細は表6に示した。

【0056】

【表6】

母液と糖蜜の混合液の混合比と略称

略 称	母液80	母液60	母液40	母液20
母液:糖蜜	80:20	60:40	40:60	20:80

【0057】

調製後40日目のサイレージを、毎日一定時間（1時間程度）攪拌して空気と混合処理を施した。これを1日の開封とした。開封直後と8日後にサンプリングし有機酸含量を測定した。対照区及び母液添加試験区でのサイレージ開封直後と8日後の有機酸含量の測定結果を図7に示した。また、対照区及び試験区での有機酸含量増加率（8日後／開封直後）を図8に示した。

【0058】

図7及び8から、サイレージ開封後の乳酸及び酢酸含量は母液割合の高い添加区ほど、その含量増加率が減少することが分かる。

【0059】

本実験のように可溶性糖の多い材料（サイレージ開封後も穀実部分が糖分として残る場合がある）をサイレージ調製したとき、サイレージ開封後も乳酸菌をはじめとする通性嫌気性微生物の活動はしばらく継続される。乳酸はホモ型及びヘテロ型乳酸菌により、酢酸はヘテロ型乳酸菌及び好氣的微生物によって生成される。また、サイレージ開封後は、酵母の活動に誘導され、好氣的微生物は活動を開始する。ここでも酵母によって酢酸は生成される。

【0060】

すなわち、本実験の結果から母液の添加比率が上がるに伴い、乳酸菌をはじめとする通性嫌気性菌、酵母及び好気性微生物の活動は抑制される。

【0061】

酪酸菌に関しては好気状態では全ての試験区で抑制されている。

【0062】

実施例6：サイレージ開封後の2次発酵によるサイレージ品質評価試験（2次発

酵過程におけるカビコロニーの消長)

母液と糖蜜の混合液を 80 : 20 ~ 20 : 80 の混合割合 (重量比) で作成し、材料の大麦ホールクロップの新鮮重当たり 3 % となるように添加し、これを 1 L ボトルに詰めこみ (詰めこみ密度 500 g FW/L) 大麦ホールクロップボトルサイレージ試験を実施した。

【0063】

対照区として母液無添加のサイレージを調製した。混合比と略称の詳細は表 7 に示した。

【0064】

【表 7】

母液と糖蜜の混合液の混合比と略称

略 称	母液80	母液60	母液50	母液40	母液20
母液:糖蜜	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80

【0065】

大麦ホールクロップボトルサイレージ試験で得られたサイレージ微生物を栄養寒天培地 (ペプトン 5 g、肉エキス 3 g、寒天 15 g、蒸留水 1000 ml、pH 6.8) にてカビコロニー数を測定した。測定は開封直後、2 日後及び 6 日後のサイレージサンプリングについて実施した。

【0066】

サイレージサンプル 20 g に蒸留水 200 ml を加え、ミキサーで 1 分間攪拌後、ガーゼ 2 枚で濾過して得た濾液を用い、上記培地にて培養した。毎日カビコロニー数を数え、平衡になった数を以ってカビコロニー測定数とした。その結果を表 8 に示した。

【0067】

表 8 に示した結果から明らかなように、母液の混合割合 50 % 以上では、開封 6 日後迄カビコロニー数が検出されなかった。

【0068】



【表 8】

## サイレージ開封後のカビコロニー数の結果

単位: c.f.u. g<sup>-1</sup>FW

試験区	対照区	母液80	母液60	母液50	母液40	母液20
開封日	$7 \times 10^7$	n. d	n. d	n. d	n. d <sup>*1</sup>	$1 \times 10^8$
2日後	$7 \times 10^7$	n. d	n. d	n. d	n. d	n. d
6日後	$7 \times 10^7$	n. d	n. d	n. d	$3 \times 10^9$	$7 \times 10^7$

\*1: 検出されず

【0069】

これは、母液添加により2次発酵に関与するカビの生育が抑制されていると示唆している。

【0070】

実施例7: 大麦ホールクロップサイレージの *in situ* ルーメン消化率の改善効果試験

母液と糖蜜の混合液を80:20~20:80の混合割合(重量比)で作成し、材料の大麦ホールクロップの新鮮重当たり3%となるように添加し、これを1Lボトルに詰めこみ(詰めこみ密度500 g FW/L)大麦ホールクロップボトルサイレージを調製した。

【0071】

対照区として母液無添加のサイレージを調製した。混合比と略称の詳細は表9に示した。

【0072】

【表 9】

## 母液と糖蜜の混合液の混合比と略称

略 称	母液80	母液60	母液50	母液40	母液20
母液:糖蜜	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80

【0073】

第1に、各試験区の調製サイレージについてそれぞれ大麦ホールクロップ全体

のうち、消化率の良い殻実部を除き、難消化性（繊維分の多い）の茎葉部の中性デタージェント繊維（NDF<sup>\*1</sup>）含量について調査した。i n s i t u<sup>\*2</sup>ルーメン消化率はルーメンフィステル装着牛の第1胃内に24時間浸漬し、乾物消失率及びNDF<sup>\*2</sup>消失率を調査した。その結果を図9及び10に示した。

\*1：中性デタージェント繊維、中性デタージェント処理残渣から灰分を除いた繊維成分、主に細胞壁を構成するセルロース、ヘミセルロース、リグニンからなる。

\*2：実際の動物を用いて消化率を測定する試験法の一つ。

#### 【0074】

まず、母液添加区では対照区に比べ、サイレージ貯蔵中に大麦ホールクロップ茎葉部の繊維成分含量の著しい低下が確認された。このことは、図9から中性デタージェント繊維（NDF）が母液添加により減少していることによって明らかである。

#### 【0075】

更に、乾物消失率と NDF 消化率の改善効果が確認された（図10参照）。

#### 【0076】

粗飼料原料のセルローズ、ヘミセルローズはリグニンと結合して難消化性マトリックス構造を形成し反芻胃内微生物に利用されにくい。即ち、これらの繊維が反芻家畜のエネルギー源として利用されないまま排泄されてしまう。しかし、母液を粗飼料に1～10%の範囲で添加することで、繊維構造の著しい崩壊が引き起こされることを電子顕微鏡で観察した。このことは、消化率の著しい改善に強く関与している。

#### 【0077】

実施例8：イタリアンライグラスボトルサイレージ試験

本実施例で用いたアミノ酸発酵副生液は、

① グルタミン酸発酵液を硫酸にてpHを等電点に調整し、析出した当該アミノ酸を固液分離したときに得られる母液を、アンモニアでpHを5程度に調整し、脱塩濃縮したときに生じた、pH4.7、窒素全量6.2（内アンモニア性窒素4.3）のグルタミン酸発酵副生液（以下、単に「Glu母液」と略称する）

② リジン発酵液を硫酸にて pH を 3 程度に調整した後、強酸性陽イオン交換樹脂に当該アミノ酸を吸着せしめた後の貫流液を、遠心分離により菌体重液と軽液に分ける。そして、軽液を水酸化ナトリウム溶液で pH を 5 程度に調整し、脱塩濃縮したときに生じた液に前述の菌体重液を混合した、pH 4.2、窒素全量 5.9 (内アンモニア性窒素 4.7) のリジン発酵副生液 (以下、単に「Lys 母液」と略称する)、および

③ 実施例 1～7 で用いたフェニルアラニン発酵副生液 (以下、単に「Phe 母液」と略称する) である。

#### 【0078】

これら Glu 母液、Lys 母液及び Phe 母液を、材料のイタリアンライグラスの新鮮重当たり 3 % となるようにそれぞれ添加し、これを 1 L ボトルに詰めこみ (詰めこみ密度 760 g FW/L) サイレージ試験を実施した。対照区として母液無添加のサイレージを調製した。

#### 【0079】

サイレージを調製後 40 日目に開封し、試料を採取、10 倍量の蒸留水を加えミキサーで粉碎し、ガーゼ濾過。濾液を遠心分離 (15,000 rpm、5 分間、5℃)。上澄み液に 2 倍量の 6 % 過塩素酸を添加し攪拌後、再度同条件で遠心分離。上澄み液を 0.45 μm フィルターで濾過し、pH および液体クロマトグラフィーでの揮発性脂肪酸を測定した。

#### 【0080】

図 11 に対照区および Glu 母液、Lys 母液及び Phe 母液添加試験区サイレージの pH をそれぞれ示した。

#### 【0081】

図 12 に対照区および Glu 母液、Lys 母液及び Phe 母液添加試験区における総有機酸濃度をそれぞれ示した。

#### 【0082】

図 13 に対照区および Glu 母液、Lys 母液及び Phe 母液添加試験区における総有機酸に占める乳酸、酢酸の割合をそれぞれ示した。

## 【0083】

図11、12、13から明らかなように、総有機酸生成量及び、総有機酸に占める乳酸の割合は、Glu母液、Lys母液及び、Phe母液添加区が、無添加区に比べて高い。これは、これらの母液がサイレージ乳酸発酵を促進し、サイレージ品質を著しく改善する効果のあることを示している。

## 【0084】

## 【発明の効果】

本発明はサイレージ原料にアミノ酸発酵副生液を添加することにより、サイレージ発酵における乳酸菌発酵の促進効果および強固な原料中繊維構造の崩壊、即ち、飼料原料中のリグニンからのセルロース及びヘミセルロースの分離促進が図られ、長期の保存性に富み、高乳酸含量で且つ高消化性で、窒素分量にも優れたサイレージを調製することができる。又、本発明はアミノ酸発酵副生液中の窒素源を有効に利用できる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 サイレージ調製用添加剤として母液単独、糖蜜単独、母液－糖蜜混合液又はグルコース単独を用い、サイレージ乳酸菌ラクトバチルス・プランタラムを培養したときの培養時間による吸光度の変化を示す図面。

【図2】 サイレージ調製用添加剤として母液の添加量の異なる母液－糖蜜混合液を用いて大麦ホールクロップボトルのサイレージ試験を実施したときの調製サイレージの総有機酸に占める乳酸、酢酸、酪酸の割合を示す図面。

【図3】 サイレージ調製用添加剤として母液の添加量の異なる母液－糖蜜混合液を用いて大麦ホールクロップボトルのサイレージ試験を実施したときの母液添加割合によるサイレージの粗蛋白含量の変化を示す図面。

【図4】 サイレージ調製用添加剤として母液単独、糖蜜単独、母液－糖蜜混合液又はグルコース単独を用い、サイレージ酵母菌を培養したときの培養時間による吸光度の変化を示す図面。

【図5】 対照区及び母液添加試験区でのサイレージ開封直後と8日後のエタノール含量を示す図面。

【図6】 対照区及び母液添加試験区でのエタノール含量増加率（8日後／

開封直後)を示す図面。

【図 7】 対照区及び母液添加試験区でのサイレージ開封直後と 8 日後の有機酸含量を示す図面。

【図 8】 対照区及び母液添加試験区での有機酸含量増加率 (8 日後／開封直後)を示す図面。

【図 9】 母液無添加区及び母液添加試験区での各サイレージの茎葉部の N D F 含量を示す図面。

【図 10】 母液無添加区及び母液添加試験区での *i n s i t u* ルーメン消化試験として牛の第 1 胃内に 24 時間浸漬後の乾物消失率及び N D F 消化率を示す図面。

【図 11】 サイレージ調製用添加剤として 3 種類のアミノ酸発酵副生液をそれぞれ用いてイタリアンライグラスボトルのサイレージ試験を行ったときの p H を示す図面。

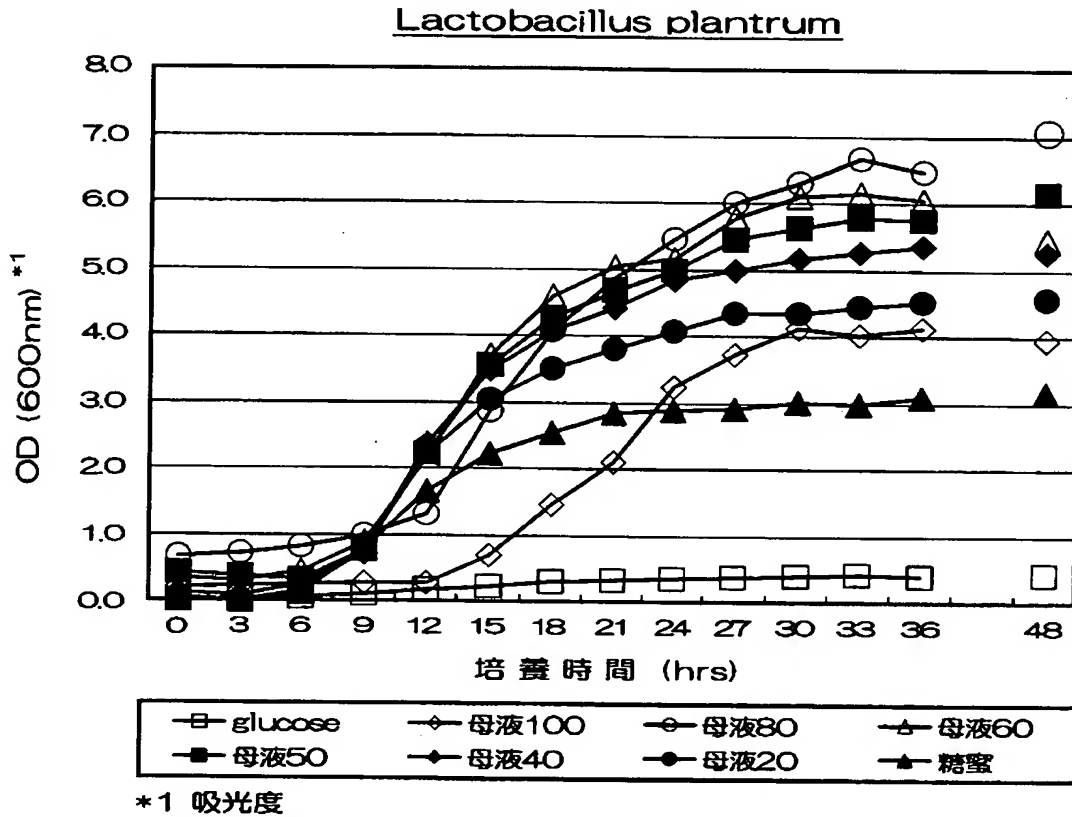
【図 12】 対照区及び 3 種類のアミノ酸発酵副生液添加試験区での総有機酸濃度を示す図面。

【図 13】 対照区及び 3 種類のアミノ酸発酵副生液添加試験区での総有機酸中に占める乳酸、酢酸の割合を示す図面。

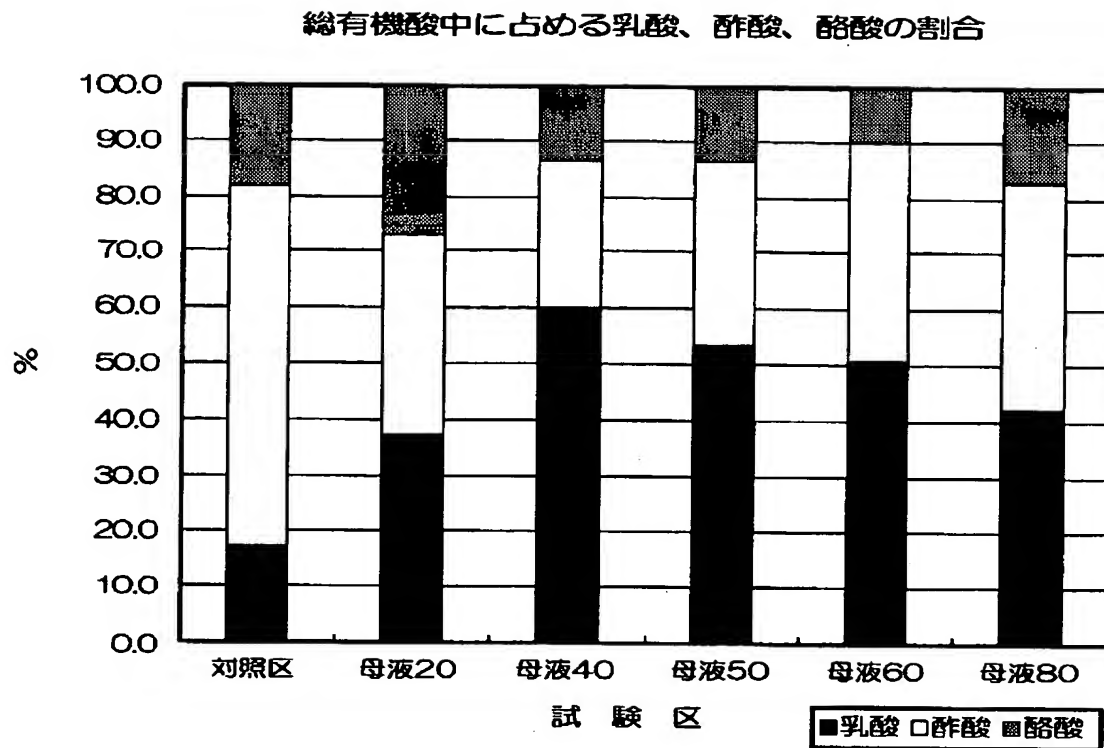
【書類名】 図 面

【図 1】

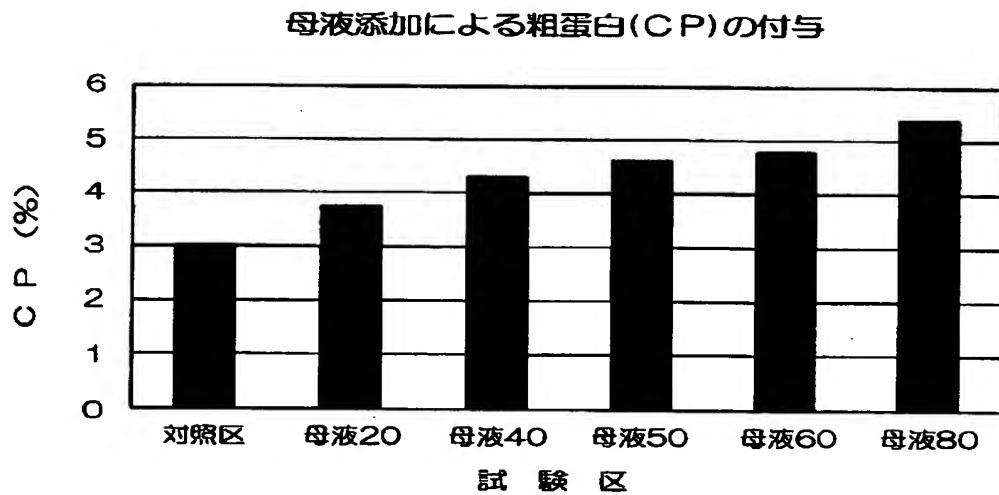
代表的サイレーシ乳酸菌を用いての単離菌培養試験結果



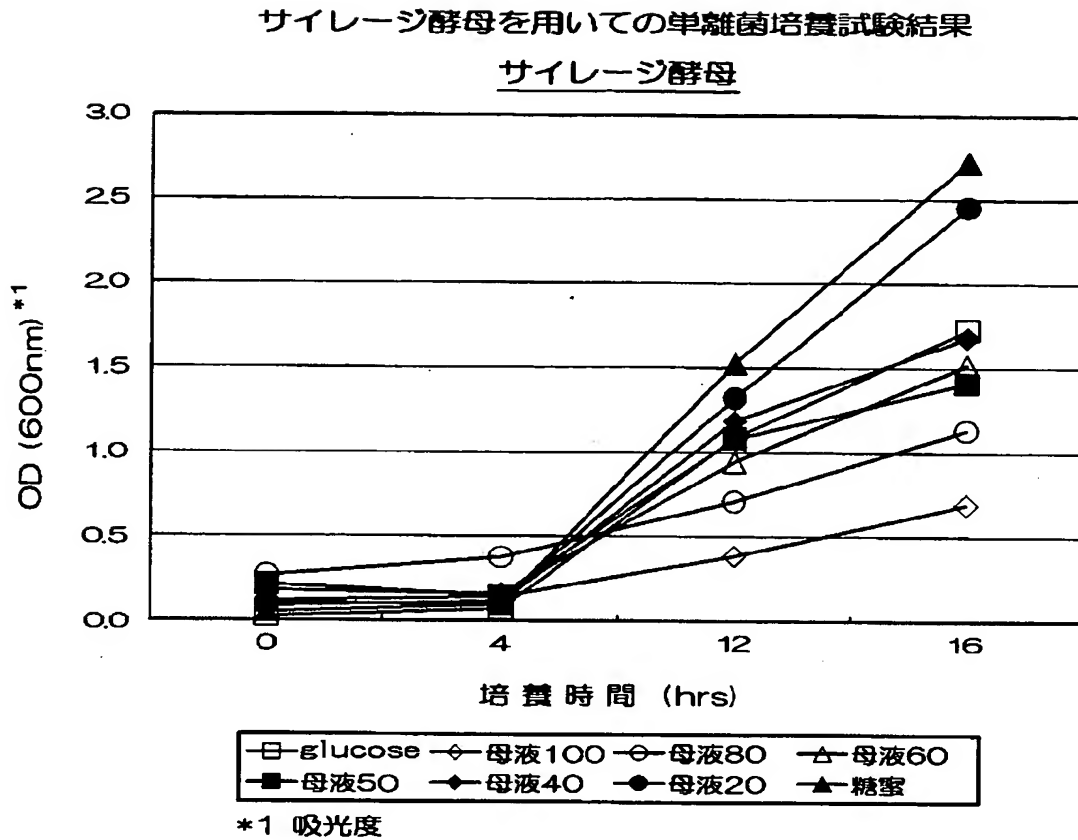
【図 2】



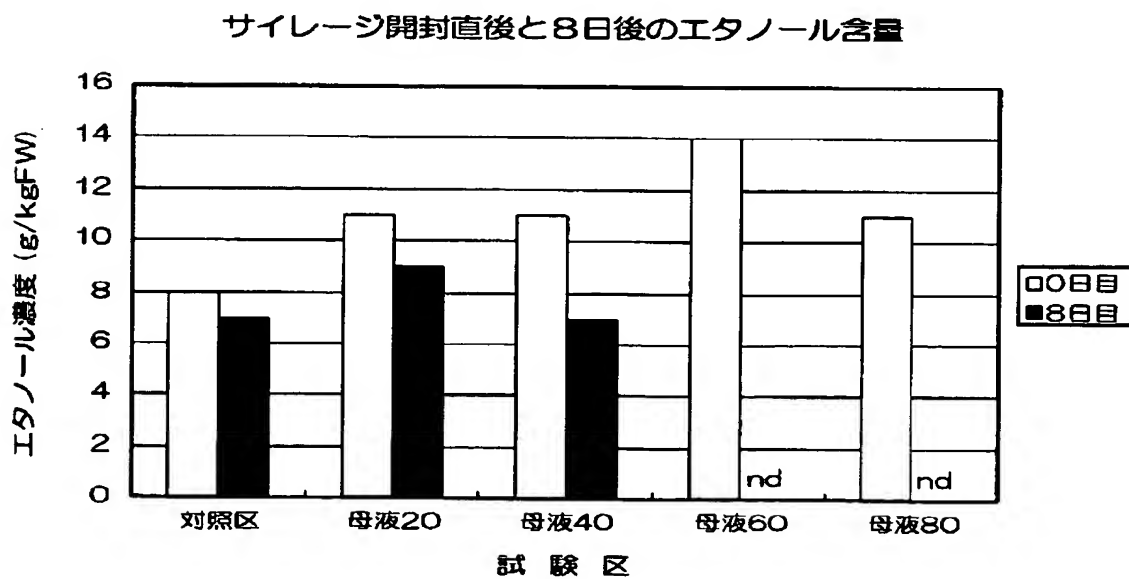
【図 3】



【図 4】

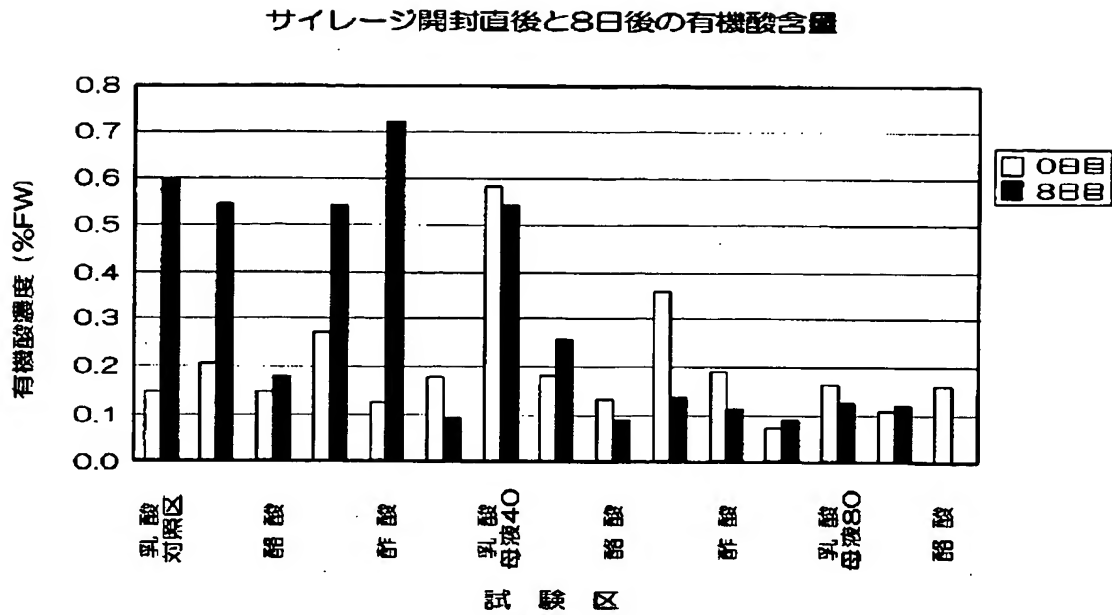


【図 5】

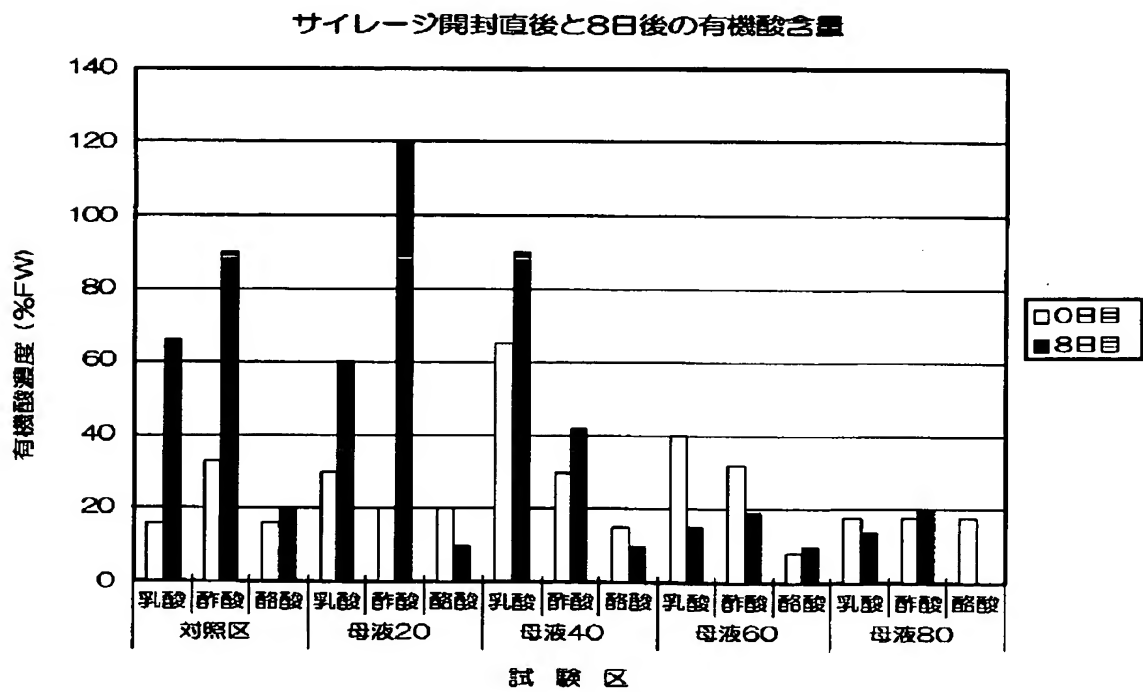




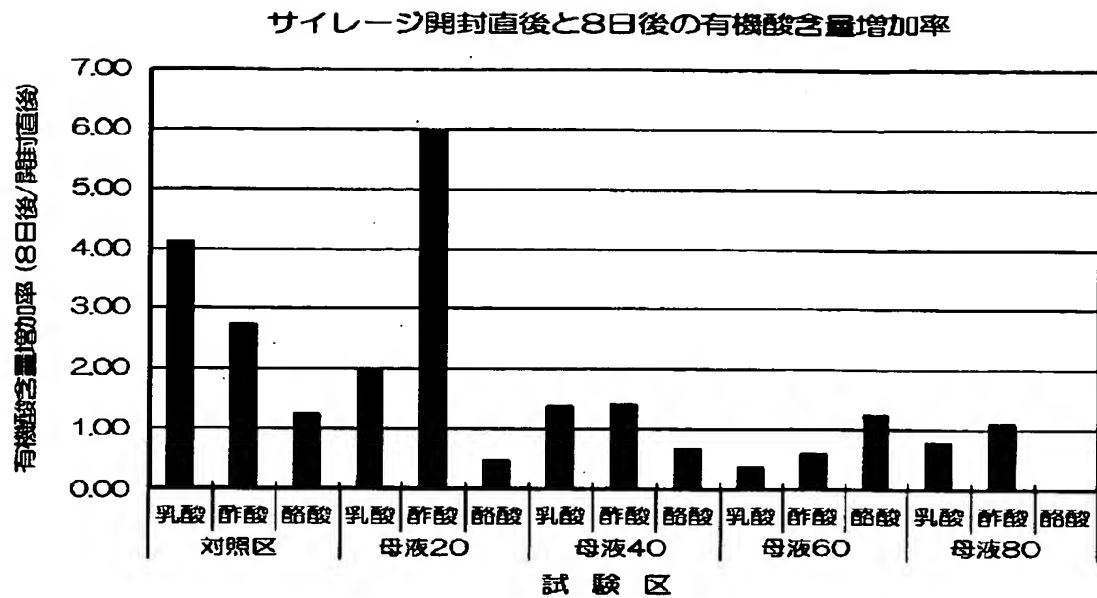
【図6】



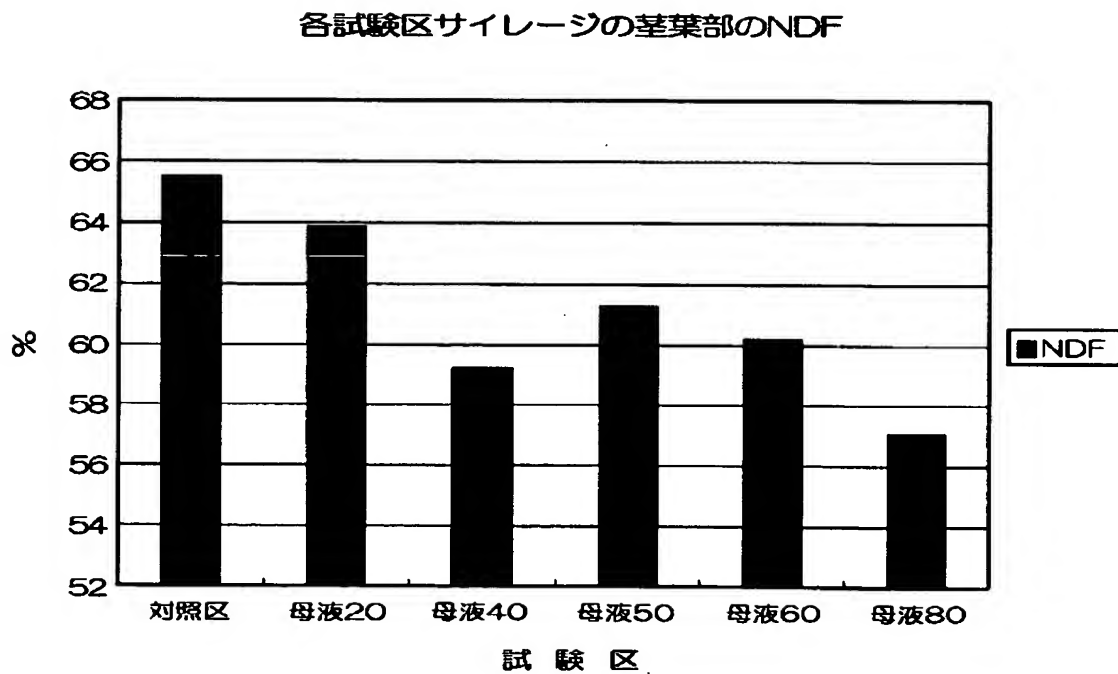
【図7】



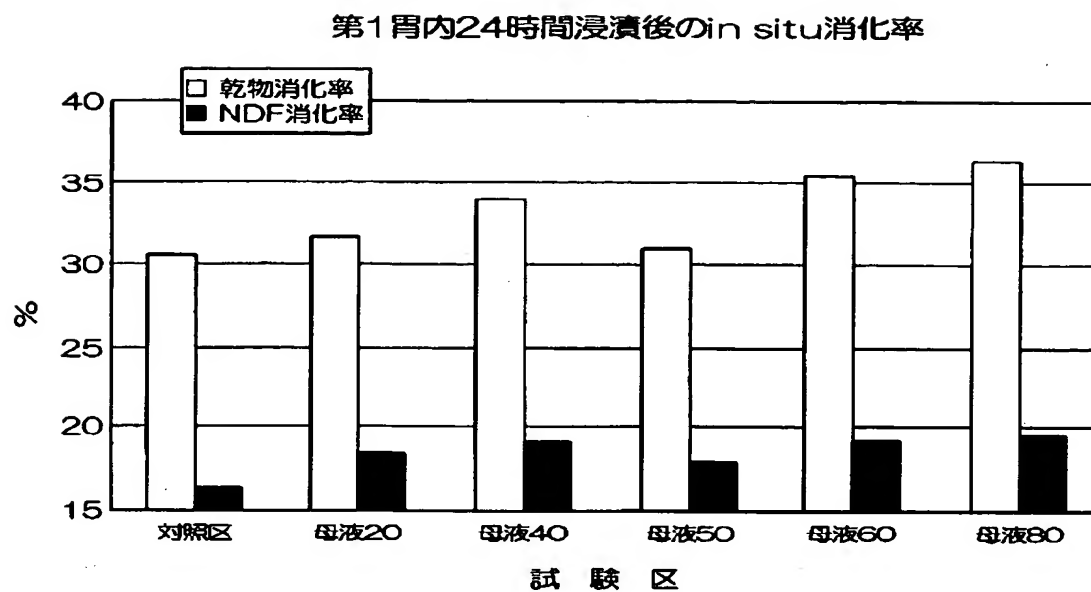
【図 8】



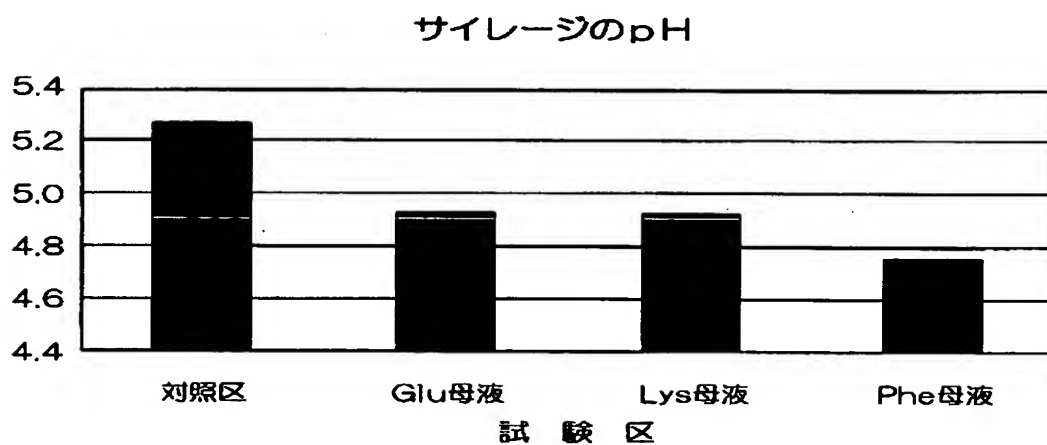
【図 9】



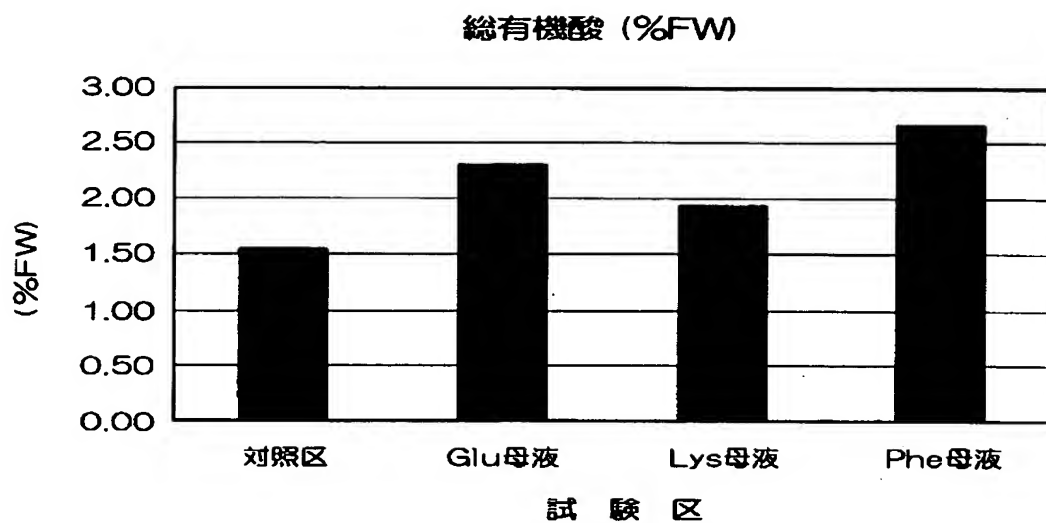
【図10】



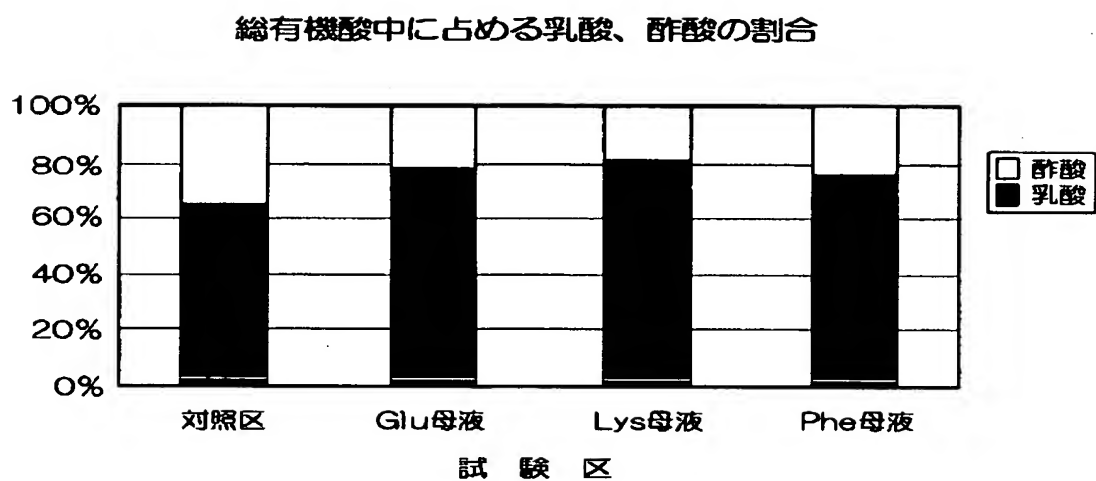
【図11】



【図 12】



【図 13】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 サイレージ発酵を改善し、併せて家畜の栄養補強と低廉なコストのサイレージ添加剤を提供する。

【解決手段】 pH 3.0～6.0の酸性領域に調整されたアミノ酸発酵副生液からなるサイレージ添加剤。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 3 - 1 7 8 2 2 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 0 6 6 ]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 7 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号

氏 名

味の素株式会社